

Research Paper

The Effect of High-Dose Ascorbic Acid on Necroptosis Pathway Activation in the HT29 Colon Cancer Cell Line



Dian Dayer ^{1*}, Zahra Shokati Eshkiki ², Kowsar Abbasi Sami ¹

1. Cellular and Molecular Research Center, Medical Basic Sciences Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2. Alimentary Tract Research Center, Clinical Sciences Research Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Use your device to scan
and read the article online



Citation Dayer D, Shokati Eshkiki Z, Abbasi Sami K. [The Effect of High-dose Ascorbic Acid on Necroptosis Pathway Activation in the HT29 Colon Cancer Cell Line]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2026; 25(1): 29-40.

<https://doi.org/10.22118/jsmj.2026.544167.3978>

ABSTRACT

Background and Objectives High doses of ascorbic acid were investigated for their effect on the expression of major necroptosis pathway genes in HT-29 colon cancer cells.

Subjects and Methods: HT-29 cells were cultured in DMEM-HG medium supplemented with 10% FBS and 1% Pen/Strep and incubated at 37°C with 5% CO₂. After reaching 90% density, the cells were trypsinized and cultured in triplicate in 12-well culture plates at a concentration of 30,000 cells per well. The cells were divided into two groups: a control group receiving only basal culture medium and a test group that received 5 mM ascorbic acid for 3 h. After 24 h, the cell supernatant and the cell pellet were collected for further analysis. LDH activity was assessed using a kinetic assay, and the proportions of apoptosis and necrosis were calculated by flow cytometry. Gene expression analysis was performed using real-time PCR. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software version 8, with comparisons performed using a t-test.

Results Microscopic images and flow cytometry results confirmed the induction of necroptosis by ascorbic acid. In addition, ascorbic acid treatment significantly increased key necroptosis gene expression and LDH activity.

Conclusion High doses of ascorbic acid activate necroptosis in HT-29 cells.

Keywords Ascorbic acid, Necroptosis, Colon cancer, HT29 cell line.

Received: 31 Aug 2025

Revised: 21 Jan 2025

Accepted: 10 Feb 2026

* Corresponding Author:

Dian Dayer

Address: Cellular and Molecular Research Center, Medical Basic Sciences Institute, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

Tel: +9163149254

E-Mail: dayer-d@ajums.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

Colorectal cancer (CRC) represents one of the most common malignancies and a leading cause of cancer-related mortality worldwide. Apoptosis may be considered the principal mechanism of elimination of the transformed cells. However, there are many cancer cells that have become resistant to apoptosis due to mutations in their genetics and epigenetics. Necroptosis can be defined as a particular form of programmed cell death. Under certain circumstances, necroptosis proves to be an efficient mechanism of elimination of the apoptosis-resistant cancer cells. High doses of ascorbic acid (AA) have gained scholarly attention due to their cytotoxic activity against cancerous cells. In prior research, including our own study, it was shown that pharmacological levels of AA cause cell death via apoptosis and suppression of angiogenesis-related signalling in HT-29 CRC cells. Nonetheless, the role of necroptosis-related pathways in the antitumor activity of AA is still poorly studied. Therefore, the current study aimed to assess the influence of high levels of AA on necroptosis-related signalling in HT-29 CRC cells.

Methods

The human colon cancer cells (HT-29) were acquired from the Iranian Biological Resource Center. The cells were grown in DMEM medium containing high glucose content along with 10% FBS (fetal bovine serum) and 1% penicillin-streptomycin solution. Cells were plated in 12-well plates at a concentration of 3×10^4 cells per well and left overnight for adhesion. Based on our previous dose-response results, we decided to use a dose of 5 mM AA (half of the IC_{50} obtained before) as a treatment dose. Cells were treated with AA for 3 h and then incubated with fresh medium for 24 h. The untreated cells were used as controls. The cell morphological changes were detected using a light microscope. Apoptosis was evaluated using Annexin V-FITC/propidium iodide flow cytometry. Lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activity was measured in cell supernatants as a marker of cell necrosis and membrane integrity. Extraction of total RNA was performed using TRIzol reagent. cDNA synthesis was performed. The quantification of the genes was evaluated by Real-time PCR. Relative expression levels of the genes were normalized to the GAPDH gene using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Statistical analysis was performed by Student's t-test, at a $p < 0.05$ significance level.

Results

Administration of a high dose of AA caused considerable changes in the morphology of HT-29 cells. As opposed to untreated controls, cells under treatment were characterized by low cellular density, poor colony formation capacity, lack of cell-cell adhesion, and morphological degradation. Flow cytometric analysis showed that 94.8% of cells in the control group retained their viability. However, exposure to 5 mM AA lowered the viability of cells to 74.8% and resulted in a considerable increase in cell death. Cells undergoing treatment exhibited 11.2% primary necrosis, 7.75% late apoptosis/secondary necrosis, and 6.31% early apoptosis. LDH activity was found to be significantly higher among the AA-exposed group relative to the control group ($P < 0.0001$), indicating increased membrane damage and cell necrosis. Further examination through gene expression demonstrated that the necroptosis signalling pathway is significantly activated as well. Gene expression of RIPK1 was significantly upregulated relative to untreated controls ($P < 0.0001$), alongside significant increases in RIPK3 and MLKL expression ($P < 0.001$). This concurrent upregulation of key necroptosis mediators suggests the activation of the classical RIPK1/RIPK3/MLKL pathway.

Conclusion

The current research shows that the application of high doses of AA stimulates the RIPK1/RIPK3/MLKL necroptosis signalling pathway in HT-29 CRC cells. The changes in morphology, high level of LDH activity, reduced cell viability, and increased expression of genes related to necroptosis are all clear evidence that necroptosis significantly affects the antitumor activity of AA. In other words, pharmacological AA could be considered a possible treatment for HT-29 CRC cells, especially those resistant to apoptosis. However, more research is needed in order to prove the efficiency of this method.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

The present paper is based on research project No. RDC-9804, approved by the Gastroenterology Research Center of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences. The experimental phase of the work was performed at the Cellular and Molecular Research Center of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences.

Funding

The authors acknowledge the Research Deputy of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences for approving this project and providing the necessary funding.

Author's contributions

DD conceptualized and designed the study. Literature searches and data extraction were performed by DD and ZSE, while experimental procedures were conducted by KAS. Data analysis was carried out by DD. The initial draft was written by DD and ZSE. All authors reviewed and approved the final version for publication. DD serves as the guarantor for this research, confirming full access to all study data and assuming responsibility for the integrity and accuracy of the analysis.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to extend their sincere appreciation to the management and staff of the Cellular and Molecular Research Center at Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences for their invaluable support and cooperation throughout this study.

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر دوز بالای اسید آسکوربیک بر فعال سازی مسیر نکروپتوز در رده سلولی HT29 سرطان کولون

دیان دایر^{۱*}، زهرا شوکتی اشکی^۲، کوثر عباسی سمیع^۱

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

۲. مرکز تحقیقات گوارش، پژوهشکده علوم بالینی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

Use your device to scan
and read the article
online



Citation Dayer D, Shokati Ashkaki Z, Abbasi Sami K. [The Effect of High-dose Ascorbic Acid on Necroptosis Pathway Activation in the HT29 Colon Cancer Cell Line]. Jundishapur Scientific Medical Journal. 2026; 25(1): 29-40.

doi <https://doi.org/10.22118/jsmj.2026.544167.3978>

چکیده



زمینه و هدف: این مطالعه به بررسی تأثیر دوز بالای اسید آسکوربیک بر بیان ژن های کلیدی مسیر نکروپتوز در سلول های HT-29 سرطان کولون اختصاص یافت.

روش بررسی: سلول های HT-29 در محیط کشت DMEM-HG حاوی ۱۰٪ FBS و ۱٪ Pen/Strep کشت داده شدند و در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی گراد حاوی ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. سلول ها پس از رسیدن به تراکم ۹۰٪ ترپسینه شدند و با تراکم ۳۰۰۰۰ سلول در هر چاهک به صورت سه بار تکرار در پلیت های کشت دوازده خانه کشت داده شدند. سلول ها به دو گروه تقسیم شدند. گروه کنترل که تنها محیط کشت پایه دریافت می کرد و گروه تست که به مدت ۳ ساعت تحت تیمار با اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار قرار می گرفت. پس از ۲۴ ساعت محیط رویی سلول ها و رسوب سلولی جهت بررسی های بعدی جمع آوری شد. درصد آپوپتوز و نکروز به روش فلوسیتومتری و اندازه گیری فعالیت LDH به روش کیتیک انجام شد. آنالیز بیان ژن ها به روش Real time PCR صورت گرفت. تحلیل آماری با استفاده از ورژن ۸ نرم افزار graph pad prism و t-test انجام شد.

یافته ها: تصاویر میکروسکوپی و نتایج فلوسیتومتری مؤید القای نکروپتوز توسط اسید آسکوربیک بودند. به علاوه، تیمار با اسید آسکوربیک میزان بیان ژن های کلیدی نکروپتوز و فعالیت LDH را به طور معنی دار افزایش داده بود.

نتیجه گیری: دوز بالای اسید آسکوربیک می تواند به عنوان عامل فعال ساز نکروپتوز در سلول های HT-29 مطرح باشد.

کلیدواژه ها: اسید آسکوربیک، نکروپتوز، سرطان کولون، رده سلولی HT-29.

تاریخ دریافت: ۹ شهریور ۱۴۰۴

دریافت اصلاحات: ۱ بهمن ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۲۱ بهمن ۱۴۰۴

* نویسنده مسئول:

دیان دایر

نشانی: مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۹۱۶۳۱۴۹۲۵۴

رایانامه: dayer-d@ajums.ac.ir

مقدمه

نکروپتوز یک نوع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و یک مکانیسم دفاعی سلول است که به عنوان مسیر پشتیبان آپوپتوز عمل می‌کند. معمولاً نکروپتوز در پاسخ به استرس‌های شدید سلولی، عفونت‌های ویروسی و یا در زمان انسداد مسیر وابسته به کاسپاز آپوپتوز بر اثر جهش‌های ژنتیکی فعال می‌شود. استرس شدید اکسیداتیو، ایسکمی و رپرفیوژن نیز از عوامل مهم فعال‌سازی مسیر نکروپتوز در سلول‌های نرمال به شمار می‌روند (۱). ولی از آنجاکه نکروپتوز یک مسیر التهابی است که در نهایت منجر به تورم سلولی، پارگی غشای پلاسما و آزاد شدن فاکتورهای التهابی می‌شود، سلول‌های نرمال به سیستم‌های کنترل دقیق نکروپتوز مجهز هستند تا از عوارض التهاب ناخواسته و نکروز بافتی در امان بمانند.

فرایند نکروپتوز توسط گیرنده‌های مرگ مانند TNFR1 و مسیرهای سیگنالینگ پایین دست آن مانند RIPK1 و RIPK3 آغاز می‌شود. RIPK3 پروتئین کلیدی MLKL را فسفریله و فعال می‌کند. اتصال MLKL به غشای پلاسمایی سبب تشکیل منافذی در غشای پلاسما می‌شود که تورم سلول، پارگی غشا و آزاد شدن محتوای سلولی به فضای خارج سلولی را به دنبال دارد. آزادسازی محتویات سلول و فاکتورهای التهابی منجر به فعال‌سازی سیستم ایمنی در ناحیه مورد نظر و حذف سلول‌های آسیب‌دیده خواهد شد (۲).

امروزه محققان زیادی در جست‌وجوی فعال‌سازی مسیر نکروپتوز در جهت از بین بردن سلول‌های سرطانی مقاوم به آپوپتوز و توسعه درمان سرطان هستند. نکروپتوز یک نقش دوگانه در سرطان ایفا می‌کند. به عبارت بهتر، نکروپتوز بسته به شرایط می‌تواند به عنوان مهارکننده یا فعال‌ساز تومور مطرح باشد. بسیاری از سلول‌های سرطانی با مهار کاسپازها از آپوپتوز فرار می‌کنند. در این شرایط نکروپتوز فعال می‌تواند به عنوان یک مسیر جایگزین برای القای مرگ در این سلول‌ها عمل کند. از طرفی التهاب ناشی از نکروپتوز ممکن است در برخی موارد به ایجاد ریزمحیطی کمک کند که رشد تومور را تسهیل می‌کند. برخی تحقیقات نشان داده‌اند که مرگ سلول‌های تومور از طریق نکروپتوز ممکن است با آزادسازی فاکتورهایی همراه باشد که متاستاز را تسهیل می‌کنند.

در برخی شرایط نیز سلول‌های سرطانی از مسیر نکروپتوز برای مقاومت نسبت به درمان‌های استاندارد استفاده می‌کنند. لذا کنترل دقیق مکانیسم‌های سلولی تنظیم‌کننده نکروپتوز در سلول‌های سرطانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۳). شواهد نشان می‌دهد نکروپتوز و آپوپتوز (وابسته به کاسپاز) می‌توانند به صورت هم‌زمان یا متوالی در سلول‌های سرطانی فعال شوند و این همکاری می‌تواند اثرات ضدتوموری قویتری ایجاد کند. این پدیده بیشتر در شرایطی که مسیرهای آپوپتوز به طور جزئی مهار شده‌اند و یا در پاسخ به درمان‌های ترکیبی قابل مشاهده است.

برخی محققان از ترکیب داروهای القاکننده آپوپتوز با مهارکننده‌های کاسپاز جهت القای هم‌زمان آپوپتوز و نکروز استفاده کرده‌اند. این استراتژی

می‌تواند برای غلبه بر مقاومت به درمان در بیماران مبتلا به سرطان مفید باشد. طبق تجربه، تومورهایی که پروتئین‌های کلیدی مسیر نکروپتوز را به خوبی بیان می‌کنند، به داروهای القاکننده نکروپتوز پاسخ بهتری می‌دهند. برخی مطالعات نیز بر استفاده هم‌زمان با ایمونوترابی جهت حذف عوارض التهابی نکروپتوز جهت افزایش اثربخشی نکروپتوز در حذف سلول‌های سرطانی تأکید دارند. کاسپاز ۸ سویچ اصلی انتخابگر مسیر آپوپتوز یا نکروپتوز به شمار می‌رود. کاسپاز ۸ کلید فعال‌سازی مسیر آپوپتوز است که با شکستن RIPK1 و RIPK3 از فعال شدن نکروپتوز جلوگیری می‌کند.

در سلول‌های سرطانی، جهش‌های ژنتیکی سرکوب‌کننده بیان کاسپاز ۸ تعادل را به سمت فعال‌سازی نکروپتوز سوق می‌دهند (۴). یافته‌های مطالعات پیشین نشان می‌دهد در برخی انواع لوسمی یا ملانوما مهار انتخابی کاسپاز ۸ سبب انتخاب نکروپتوز به جای آپوپتوز خواهد شد (۵). طبق تحقیقات ترکیب دوز بالای داروهای شیمی‌درمانی SMAC mimetic با مهارکننده‌های کاسپاز نکروپتوز را فعال می‌کند (۶). درحالی‌که دوز پایین این داروها در ترکیب با مهارکننده کاسپاز هر دو مسیر آپوپتوز و نکروز را فعال خواهد ساخت (۷). همچنین کاربرد Z-VAD-FMK و TNF- α در سلول‌های MCF-7 سرطان پستان با کمبود کاسپاز ۳، هر دو مسیر آپوپتوز و نکروز را فعال می‌کند (۸). طبق تحقیقات پیشین اسید آسکوربیک به عنوان یک عامل پرواکسیدانی می‌تواند فعال‌کننده تولید ROS باشد.

سلول‌های سرطانی بدلیل متابولیسم بالا غلظت بالایی از مواد اکسیدکننده تولید می‌کنند. لذا این سلول‌ها نسبت به افزایش غلظت ROS حساس‌تر از سلول‌های نرمال هستند. از این جهت، اسید آسکوربیک القاگر آپوپتوز سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود (۹).

برخی مطالعات پیشنهاد کرده‌اند در شرایطی که سلول‌های سرطانی با مهار آپوپتوز مقاومت به درمان نشان می‌دهند، کاربرد اسید آسکوربیک می‌تواند از طریق القای نکروپتوز در مرگ این سلول‌ها مؤثر باشد (۹). همچنین برخی شواهد موجودند که اسید آسکوربیک می‌تواند هم‌زمان هر دو مسیر آپوپتوز و نکروپتوز را فعال کند (۱۰). سلول‌های نرمال نسبت به دوز بالای اسید آسکوربیک ایمن هستند در صورتی که همین دوز برای سلول‌های سرطانی دوز کشنده محسوب می‌شود. لذا اسید آسکوربیک به عنوان درمان فاقد عوارض ثانویه سرطان و جایگزینی جهت شیمی‌درمانی مطرح است (۱۱).

مطالعه قبلی ما نشان داد که دوز بالای اسید آسکوربیک می‌تواند با القای آپوپتوز و مهار هم‌زمان آنژیوژنز سبب مهار رشد و زنده‌مانی سلول‌های HT-29 سرطان کولون شود (۱۲). یافته‌های مطالعه قبلی، ما را بر آن داشت که تأثیر احتمالی دوز بالای اسد آسکوربیک را بر القای نکروپتوز نیز مورد بررسی قرار دهیم. لذا این تحقیق به بررسی فعال‌سازی بیان پروتئین‌های کلیدی مسیر نکروپتوز در سلول‌های HT-29 در معرض غلظت بالای اسید آسکوربیک اختصاص یافت.

روش بررسی

کشت سلولی

مقاله حاضر بخشی از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز با کد تصویب RDC-9804 و کد اخلاق IR.AJUMS.REC.1398.606 است. سلول‌های سرطان کولون انسانی رده HT-29 (کد: IBRC C10097) از بانک سلولی مرکز ملی ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شدند. سلول‌ها در فلاسک‌های کشت در شرایط استریل و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ نگهداری شدند. محیط کشت سلولی هر دو روز یکبار تعویض می‌شد. پس از ایجاد تراکم ۹۰٪ سلول‌ها پاساژ داده شدند. محیط کشت سلولی مورد استفاده DMEM-HG (بیوآیدیا، ایران) حاوی ۱۰٪ FBS (سیگما، آمریکا) و ۱٪ Pen/Strep (سیگما، آمریکا) بود.

تیمار سلول‌ها

پس از ایجاد تراکم ۸۰ تا ۹۰٪ سلول‌های HT-29 با کاربرد تریپسین ۰.۲۵٪ (سیگما، آمریکا) از فلاسک‌ها جداسازی شدند. تعداد سلول‌های زنده با کاربرد تریپان بلو (سیگما، آمریکا) تعیین شد. تعداد ۳۰ هزار سلول در هر چاهک پلیت کشت ۱۲ خانه کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. با توجه به اینکه در تحقیق قبلی ما دوز ۱۰ میلی‌مولار اسید آسکوربیک به عنوان IC50 مؤثر در القای آپوپتوز تعیین شده بود (12)، در مطالعه حاضر دوز ۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک (IC50/2) به عنوان دوز مؤثر آن انتخاب شد.

محیط کشت رویی تخلیه شد و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت با محلول ۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک (سیگما، آمریکا) انکوبه شدند. پس از این مدت، اسید آسکوربیک با محیط کشت سلولی جایگزین شد و سلول‌ها مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂ نگهداری شدند. سلول‌های گروه کنترل با همان تراکم در چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه کشت داده شدند و در تمام مدت انکوباسیون سلول‌های تیماری، تنها در مجاورت محیط کشت قرار داشتند. در مرحله بعدی محیط کشت سلولی جمع‌آوری و فریز شد. سلول‌ها با کاربرد تریپسین جداسازی شدند و رسوب سلولی تا زمان اندازه‌گیری میزان بیان ژن‌ها در فریزر منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

فلوسیتومتری

به منظور تشخیص میزان آپوپتوز و نکروز، سلول‌های هر دو گروه در ابتدا تریپسینه شدند. سلول‌ها سه بار با PBS (بیوآیدیا، ایران) سرد شست‌وشو داده شدند. سپس سلول‌ها با غلظت ۱۰^۷ سلول در میلی‌لیتر در بافر آنکسین غوطه‌ور شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به میکروتیوب تمیز منتقل شد و به صورت متوالی ابتدا ۵ میکرولیتر آنکسین و سپس ۱۰ میکرولیتر پروپیوم پدات به آن اضافه شد. میکروتیوب به ملایمت ورتکس شد و به مدت ۱۵ دقیقه در تاریکی در دمای اطاق انکوبه شد. سپس ۴۰۰ میکرولیتر محلول Annexin binding buffer به آن افزوده و نمونه

در دستگاه فلوسیتومتر قرار داده شد.

اندازه‌گیری فعالیت LDH

جهت تعیین کمی LDH از کیت پارس آزمون 9720 ساخت ایران استفاده شد. اساس واکنش از نوع کینتیک و طبق تبدیل اسید لاکتیک به اسید پیروویک و احیای هم‌زمان NAD⁺ به NADH₂ بود. برای شروع، ۴ حجم از بافر فسفات پیرووات با یک حجم از بافر NADH مخلوط شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی سلول‌های گروه کنترل یا تست با یک میلی‌لیتر از مخلوط دو بافر اولیه میکس شد و جذب نوری آن پس از ۱، ۲، و ۳ دقیقه در طول موج ۳۴۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد میانگین سه جذب نوری محاسبه شده و در عدد ثابت ۱۶۰۳۰ ضرب شد.

روش استخراج RNA

RNA سلول‌های تیمار شده و سلول‌های گروه کنترل با کاربرد معرف تریزول (اینویترژن، آمریکا) مطابق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. غلظت و کیفیت RNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ (ترموفیشر، آمریکا) تعیین شد. RNAهای دارای OD ۲۶۰/۲۸۰ بین ۱.۸ تا ۲ به عنوان RNA دارای کیفیت مطلوب انتخاب شدند.

سنتز cDNA

cDNA در حجم ۲۰ میکرولیتر و با کاربرد غلظت یک میکروگرم از RNA و پرایمر Oligo dt با کاربرد کیت فرمنتاز (آمریکا) طبق پروتکل کیت سنتز شد.

Real time PCR

توالی پرایمرهای کاربردی در جدول ۱ آورده شده است. Real time PCR با کاربرد مستر میکس 2X سایبر گرین (تاکارا، ژاپن) و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس، ۰/۵ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای Forward و Reverse (با غلظت ۲۰۰ نانو مولار)، ۳۰۰ نانوگرم cDNA و آب مقطر دیونیزه بود. برنامه حرارتی عبارت بود از ۵ دقیقه دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی‌گراد و سپس ۴۵ سیکل حرارتی که هر سیکل شامل ۲۰ ثانیه حرارت ۹۴ درجه سانتی‌گراد و سپس ۳۰ ثانیه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد بود.

نمونه‌های کنترل منفی شامل یک نمونه کنترل منفی بدون cDNA و یک نمونه کنترل منفی بدون پرایمر بودند. واکنش تکثیر در دستگاه Step one plus thermos cycler ساخت آمریکا انجام شد. میزان بیان ژن‌ها نسبت به ژن کالبراتور GAPDH نرمالیزه شد و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد.

یافته‌ها

تأثیر اسید آسکوربیک بر مورفولوژی سلولی

سلول‌های HT29 تحت تیمار با اسید آسکوربیک (شکل ۱ A) در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل (شکل ۱ B) از تراکم و چسبندگی کمتری برخوردار بودند و توانایی تجمع و تشکیل کلون نیز در آنها به‌طور

LDH را نسبت به گروه کنترل به طور معنی دار افزایش داد ($P < 0.001$) (شکل ۳).

تیمار سلول های HT29 با اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار سبب افزایش فعالیت LDH نسبت به گروه کنترل شد. آزمایش به صورت سه بار تکرار انجام شد ($P < 0.001$).

تأثیرات اسید آسکوربیک بر بیان ژن های کلیدی نکروپتوز

تیمار سلول های HT-29 با اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار سبب افزایش معنی دار بیان ژن های کلیدی مؤثر در پیشبرد نکروپتوز شد. نتایج حاکی از آن بود که سلول های تیمار شده با اسید آسکوربیک ژن های RIPK1, RIPK3, MLKL را به صورت معنی دار بالاتر از گروه کنترل بیان می کنند ($P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$). بنابراین اسید آسکوربیک می تواند به عنوان القاکننده نکروپتوز در سلول های HT-29 مطرح باشد (شکل ۴).

بیان ژن های MLK, RIPK1, RIPK3 در سلول های HT-29 پس از ۳ ساعت تیمار با اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار در مقایسه با گروه کنترل. بیان ژن ها با روش Real time PCR اندازه گیری شده است. تمامی آزمایشات به صورت سه بار تکرار انجام شده اند ($P < 0.001$).

قابل توجهی کاهش یافته بود (شکل ۱).

سلول های HT-29 به تعداد ۳۰ هزار سلول در هر چاهک پلیت کشت ۱۲ خانه کشت داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 انکوبه شدند (A,B). سلول های گروه تست به مدت ۳ ساعت با محلول ۵ میلی مولار اسید آسکوربیک (سیگما، آمریکا) انکوبه شدند (B). تیمار با اسید آسکوربیک سبب کاهش تعداد کلون های سلول های زنده و تغییر مورفولوژی سلول ها شد (بزرگ نمایی: $100 \times$).

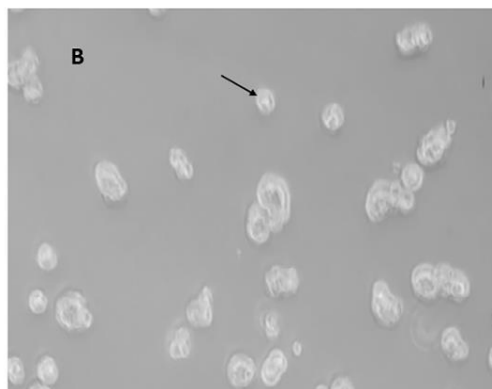
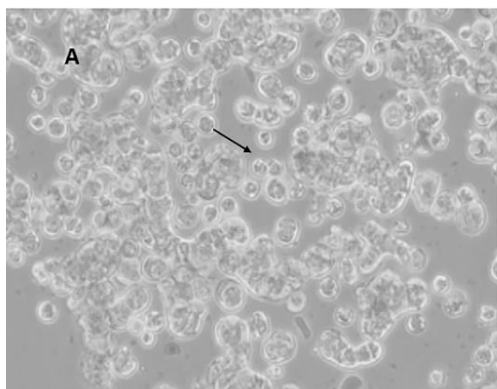
مقایسه میزان آپوپتوز و نکروز پس از مواجهه سلولی با اسید آسکوربیک

نتایج تست فلوسیتومتری با آنکسین و PI نشان داد که مواجهه با اسید آسکوربیک سبب القای هم زمان نکروز و آپوپتوز در سلول های HT29 می شود (شکل ۲).

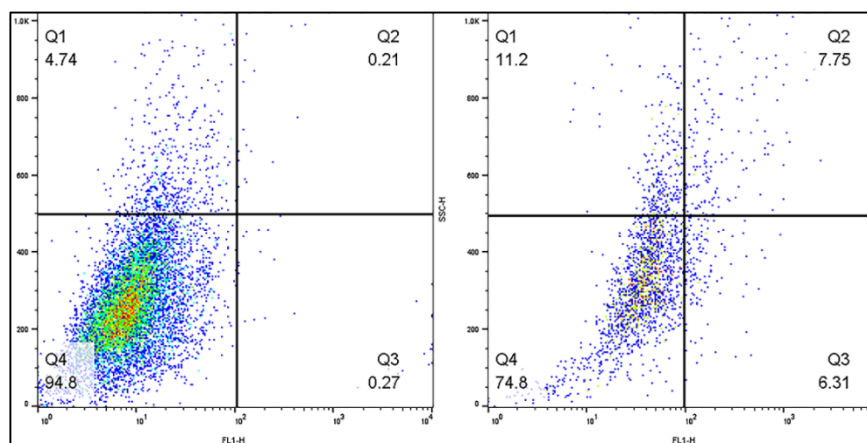
مطابق نتایج فلوسیتومتری ۹۴/۸٪ از سلول های HT29 در حالت نرمال زنده هستند (A) در حالی که تأثیر اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار جمعیت سلول های زنده را به ۷۴/۸٪ کاهش داد و سبب ایجاد ۱۱/۲٪ نکروز خالص، ۷/۷۵٪ آپوپتوز دیررس (نکروز) و ۶/۳۱٪ آپوپتوز اولیه شد (B) ($P < 0.05$; $P < 0.001$).

تأثیر اسید آسکوربیک بر فعالیت LDH

تیمار سلول های HT29 با اسید آسکوربیک ۵ میلی مولار فعالیت آنزیم

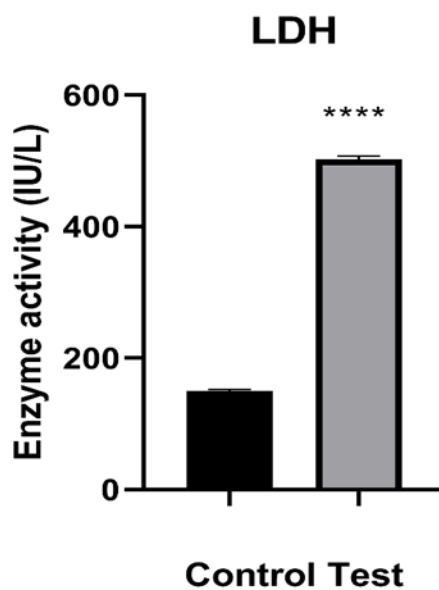


شکل ۱. تأثیر تیمار با اسید آسکوربیک بر مورفولوژی سلول

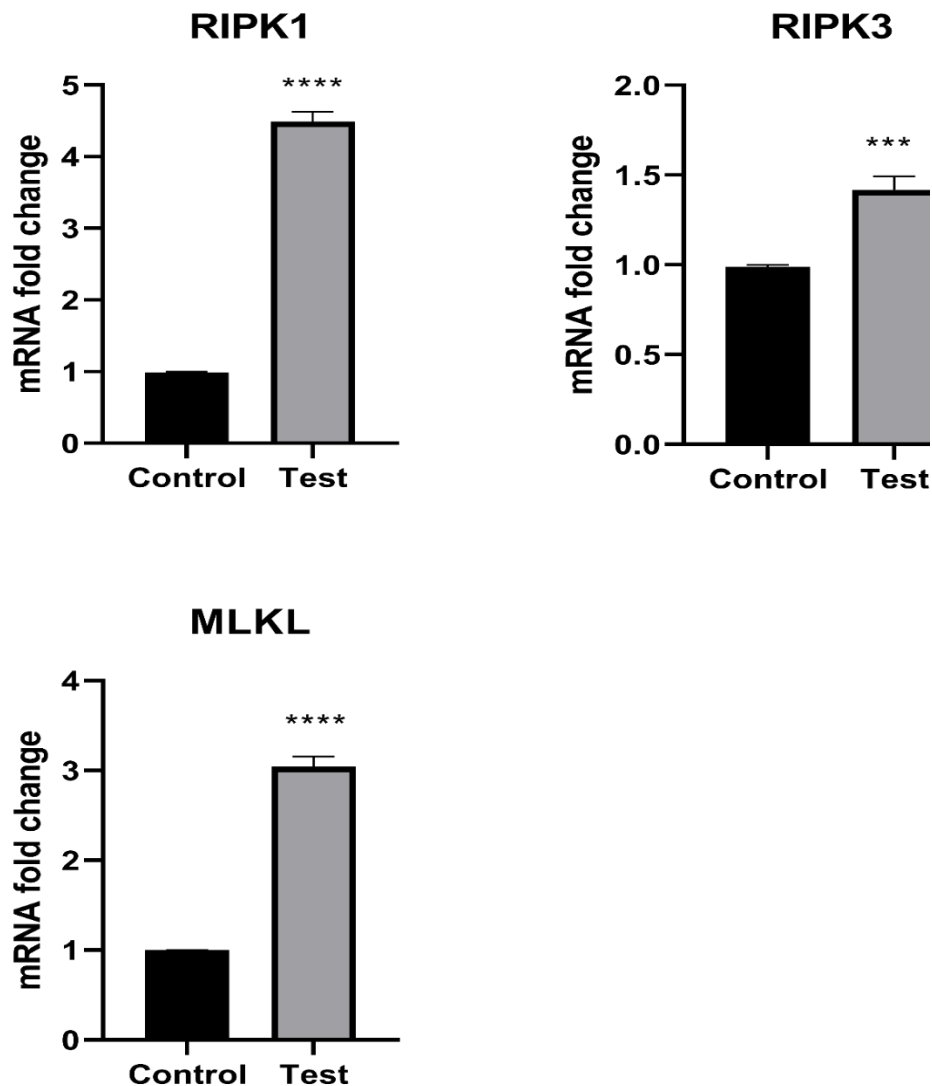


	درصد سلول زنده	درصد نکروز	درصد آپتوز اولیه	درصد آپتوز ثانویه
گروه کنترل	۹۴/۸	۴/۷۴	۰/۲۷	۰/۲۱
گروه تست	۷۴/۸*	۱۱/۲*	۶/۶۳***	۷/۷۵***

شکل ۲. تأثیر تیمار با اسید آسکوربیک بر ایجاد آپتوز و نکروز



شکل ۳. تأثیر تیمار با اسید آسکوربیک بر فعالیت LDH



شکل ۴. تأثیر تیمار با اسید آسکوربیک بر بیان ژن‌های مرتبط با نکروپتوز

بحث

کاربردی به‌عنوان داروی شیمی‌درمانی قادرند به‌صورت هم‌زمان آپوپتوز و نکروپتوز را فعال‌سازی کنند (۱۳، ۱۴). نتایج تحقیقات دیائو (Diao) و همکاران نشان داد که داروی شیمی‌درمانی Paclitaxel می‌تواند با فعال‌سازی RIPK1 و RIPK3 نکروپتوز را در سلول‌های سرطانی ریهٔ ردهٔ A549 فعال کند (۱۴، ۱۵). در مطالعهٔ لیائو (Liao) و همکاران طبق یافته‌های حاصل از فلوسیتومتری و اندازه‌گیری فعالیت LDH، paclitaxel در مراحل G2/M چرخهٔ سلولی سبب راه‌اندازی هر دو مسیر آپوپتوز و نکروپتوز در سلول‌های U937 لوسمی می‌شود (۱۶). مطالعهٔ لینگهو (LingHu) و همکاران نشان داد که در شرایط مختل‌شدن مسیر آپوپتوز در سلول‌های U87 یا U373 گلیوبلاستوما، Bufalin می‌تواند با فعال‌سازی $TNF-\alpha$ و در نهایت RIPK1 مسیر

دیرزمانی است که محققان در سراسر جهان به‌دنبال مسیر قطعی درمان انواع سرطان هستند. در حالت نرمال بدن، آپوپتوز مسیر اصلی مقابله با پیدایش و تکثیر سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود. متأسفانه در شرایط خاص بر اثر جهش‌های ژنتیکی، برخی سلول‌های بدن توانایی انجام آپوپتوز را از دست می‌دهند. در این شرایط فعال‌سازی مسیر نکروپتوز به‌عنوان یک مکانیسم جبرانی می‌تواند در حذف سلول‌های جهش‌یافته و جلوگیری از پیشرفت سرطان مثر و ثمر واقع شود. معمولاً وقتی که مسیر آپوپتوز به‌علت ازکارافتادن فعال‌سازی کاسپاز ۸ غیرفعال می‌شود، نکروپتوز به‌صورت جبرانی فعال می‌شود. نتایج تحقیقات پیشین نشان می‌دهد برخی ترکیبات

دچار مرگ شده بودند و نکروز عامل اصلی مرگ بود. نتایج این تحقیق مشابه با نتایج تحقیق ما حاکی از آن است که اسید آسکوربیک در دوزهای بالا می‌تواند عامل نکروز سلول‌های سرطانی باشد (۱۱).

مطالعات متعددی تأثیرات درمانی اسید آسکوربیک را بر درمان سرطان در حیوانات آزمایشگاهی تأیید کرده‌اند. به‌علاوه، نتایج کارآزمایی‌های بالینی نیز مؤید نقش مفید اسید آسکوربیک در کنترل پیشرفت سرطان هستند.

در مجموع، با در نظر گرفتن نقش مؤثر اسید آسکوربیک در القای هم‌زمان آپوپتوز و نکروز در سلول‌های سرطانی، و تأکید مقالات علمی پیشین بر عدم سمیت اسید آسکوربیک در سلول‌های نرمال، این ویتامین به‌عنوان گزینه مناسبی جهت کمک به درمان پیشرفت سرطان محسوب می‌شود (۱۶). گرچه کاربرد صحیح این ویتامین در درمان و مهار سرطان، نیازمند تعیین دوز دقیق کاربردی و انجام مطالعات گسترده بالینی جهت اطمینان از عملکرد دقیق و اجتناب از بروز عوارض ثانویه مصرف بر سلول‌های نرمال بدن انسان است.

نتیجه‌گیری

نتایج طرح حاضر نشان داد که اسید آسکوربیک در دوز بالا می‌تواند عامل مؤثری در القای نکروپتوز در سلول‌های HT29 سرطان کولون باشد. تلفیق نتایج این طرح با نتایج قبلی به‌دست‌آمده توسط تیم تحقیقاتی ما نشان می‌دهد که اسید آسکوربیک فعال‌ساز هم‌زمان آپوپتوز و نکروپتوز در سلول‌های HT29 محسوب می‌شود. القای نکروپتوز می‌تواند اثرات آپوپتوز را در جهت مهار رشد سلول‌های سرطان کولون HT29 تقویت کند. لذا اسید آسکوربیک گزینه مناسبی جهت کنترل گسترش سلول‌های HT29 محسوب می‌شود. یکی از محدودیت‌های این مطالعه عدم بررسی اثرات مهارکننده‌های اختصاصی مسیر نکروپتوز حین افزایش اسید آسکوربیک است. افزون‌براین، تعیین احتمال کاربرد اسید آسکوربیک به‌عنوان داروی مکمل در مهار رشد تومورهای سرطان کولون مستلزم انجام آزمایشات درون تن و بالینی تکمیلی به‌صورت گسترده است.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مقاله حاضر برگرفته از طرح تحقیقاتی شماره RDC-9804 مصوب مرکز تحقیقات گوارش دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز است. مراحل عملی کار در مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز انجام شده‌اند.

نکروپتوز را به‌عنوان یک مسیر جایگزین راه‌اندازی کند (۱۷).

اسید آسکوربیک در دوزهای فارماکولوژیک آن به‌دلیل واکنش فنتون و تولید رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل می‌تواند سبب تولید پلی ADP-ribose پلی‌مراز ۱ شده و با تخلیه ذخیره ATP سلول موجبات آسیب DNA و تخریب سلول‌های سرطانی را فراهم کند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهند اسید آسکوربیک در دوزهای بالا علاوه‌بر آپوپتوز می‌تواند فعال‌کننده مسیر نکروپتوز هم باشد (۱۷). بک (Baek) و همکاران تأثیر اسید آسکوربیک را بر سلول‌های Hep2 سرطان حنجره نشان دادند. نتایج مطالعه ایشان نشان داد اسید آسکوربیک بدون اینکه سبب فعال‌سازی کاسپازها شود از طریق مسیرهای وابسته به تولید ROS، فعال‌سازی PKC و سیگنالینگ وابسته به کلسیم سیتوزولی سبب القای نکروز می‌گردد (۱۸).

تحقیقات قبلی ما نشان داد دوز ۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک می‌تواند سبب افزایش تولید ROS در سلول‌های HT-29 شود، فرایند آپوپتوز را تحریک کند و با مهار هم‌زمان آنژیوژن در این سلول‌ها از پرولیفراسیون آنها ممانعت به‌عمل آورد (۱۲، ۱۹). تحلیل نتایج تحقیق حاضر ما نیز بر فعال‌سازی مسیر نکروپتوز پس از مواجهه سلول‌های HT-29 با اسید آسکوربیک دلالت دارند. لذا دوز بالای اسید آسکوربیک به‌عنوان عامل فعال‌ساز هم‌زمان هر دو مسیر آپوپتوز و نکروپتوز در سلول‌های HT-29 مطرح می‌شود.

چن (Chen) و همکاران در تحقیقی جامع به بررسی تأثیرات غلظت‌های مختلف اسید آسکوربیک در زمان‌های مختلف بر انواع سلول‌های سرطانی و نرمال پرداختند. در این تحقیق میزان زنده‌مانی انواع سلول‌های نرمال پس از تأثیر اسید آسکوربیک هیچ تغییر معنی‌داری نشان نداد، درحالی‌که همین دوز از اسید آسکوربیک سبب کاهش زنده‌مانی سلول‌های سرطانی شد. نکته جالب توجه این بود که میزان تأثیر اسید آسکوربیک بر زنده‌مانی رده‌های مختلف سلولی سرطانی با یکدیگر متفاوت بود و بنابر ماهیت سلولی متفاوت بود. در بخش دیگری از این مطالعه محققان تأثیر دوزهای مختلف اسید آسکوربیک را بر رده سلول سرطانی لنفو بورکیت بررسی کردند و متوجه شدند که درصد مرگ سلولی به‌صورت وابسته به دوز اسید آسکوربیک در دوزهای بالاتر به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد. دوزهای پایین اسید آسکوربیک مرگ سلولی را از طریق آپوپتوز اولیه و یا ثانویه القا می‌کرد، درحالی‌که با افزایش غلظت اسید آسکوربیک از ۰/۵ میلی‌مولار به بالا درصد نکروز افزایش می‌یافت. در غلظت ۵ میلی‌مولار اسید آسکوربیک نکروز عامل عمده مرگ سلولی محسوب می‌شد. در بخش بعدی تحقیق اسید آسکوربیک ۲ میلی‌مولار به سلول‌ها اضافه شد و یک ساعت با سلول‌ها مواجه شد. سپس درصد مرگ سلولی به‌صورت وابسته به زمان پس از مواجهه محاسبه شد. در این حالت نیز با گذشت زمان مرتب بر میزان مرگ سلولی اضافه شد. نکروز ۶ ساعت پس از مواجهه شروع شد و با گذشت زمان به‌تدریج جایگزین آپوپتوز گردید، به‌طوری‌که در زمان ۲۲ ساعت پس از مواجهه بیش از ۹۰٪ از سلول‌ها

حامی مالی

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز را بابت تصویب و تأمین بودجه ابراز می‌دارند.

مشارکت نویسندگان

دیان دایر طرح مفهومی و طراحی مطالعه را بر عهده داشت. جستجوی منابع و استخراج داده‌ها توسط دیان دایر و زهرا شوکتی اشکیکی انجام شد، در حالی که مراحل عملیاتی آزمایش‌ها توسط کوثر عباسی سمیع اجرا گردید. تحلیل داده‌ها توسط دیان دایر صورت گرفت. پیش‌نویس اولیه مقاله توسط دیان دایر و زهرا شوکتی اشکیکی نوشته شد. تمامی نویسندگان نسخه نهایی را پیش از انتشار، بازبینی و تأیید کردند. دیان دایر به عنوان ضامن این پژوهش، دسترسی کامل به تمامی داده‌های مطالعه را تأیید کرده و مسئولیت صحت و یکپارچگی داده‌ها و دقت تحلیل‌ها را بر عهده می‌گیرد.

تعارض منافع

تمامی نویسندگان تأیید می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

تشکر و قدردانی

از ریاست و پرسنل محترم مرکز تحقیقات سلولی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز بابت همکاری در اجرای پروژه سپاس‌گزاری می‌شود.

References

1. Ye K, Chen Z, Xu Y. The double-edged functions of necroptosis. *Cell death & disease*. 2023 Feb 27;14(2):163. [[10.1038/s41419-023-05691-6](https://doi.org/10.1038/s41419-023-05691-6)][PMID]
2. Seo J, Nam YW, Kim S, Oh DB, Song J. Necroptosis molecular mechanisms: Recent findings regarding novel necroptosis regulators. *Experimental & molecular medicine*. 2021 Jun;53(6):1007-17. [[10.1038/s12276-021-00634-7](https://doi.org/10.1038/s12276-021-00634-7)][PMID]
3. Yan J, Wan P, Choksi S, Liu ZG. Necroptosis and tumor progression. *Trends in cancer*. 2022 Jan 1;8(1):21-7. [[10.1016/j.trecan.2021.09.003](https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.09.003)][PMID]
4. Long K, Gu L, Li L, Zhang Z, Li E, Zhang Y, He L, Pan F, Guo Z, Hu Z. Small-molecule inhibition of APE1 induces apoptosis, pyroptosis, and necroptosis in non-small cell lung cancer. *Cell death & disease*. 2021 May 18;12(6):503. [[10.1038/s41419-021-03804-7](https://doi.org/10.1038/s41419-021-03804-7)][PMID]
5. Li X, Li F, Zhang X, Zhang H, Zhao Q, Li M, Wu X, Wang L, Liu J, Wu X, Ou Y. Caspase-8 auto-cleavage regulates programmed cell death and collaborates with RIPK3/MLKL to prevent lymphopenia. *Cell Death & Differentiation*. 2022 Aug;29(8):1500-12. [[10.1038/s41418-022-00938-9](https://doi.org/10.1038/s41418-022-00938-9)][PMID]
6. Hannes S, Karlowitz R, van Wijk SJ. The Smac mimetic BV6 cooperates with STING to induce necroptosis in apoptosis-resistant pancreatic carcinoma cells. *Cell death & disease*. 2021 Aug 30;12(9):816. [[10.1038/s41419-021-04014-x](https://doi.org/10.1038/s41419-021-04014-x)][PMID]
7. Wang L, Hu C, Zhao Y, Hu X. Novel smac mimetic ASTX660 (Tolinapant) and TNF- α synergistically induce necroptosis in bladder cancer cells in vitro upon apoptosis inhibition. *Biochemical and biophysical research communications*. 2022 Apr 30;602:8-14. [[10.1016/j.bbrc.2022.02.053](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.02.053)][PMID]
8. Shahsavari Z, Karami-Tehrani F, Salami S, Ghasemzadeh M. RIP1K and RIP3K provoked by shikonin induce cell cycle arrest in the triple negative breast cancer cell line, MDA-MB-468: necroptosis as a desperate programmed suicide pathway. *Tumor Biology*. 2016 Apr;37(4):4479-91. [[10.1007/s13277-015-4258-5](https://doi.org/10.1007/s13277-015-4258-5)][PMID]
9. Maekawa T, Miyake T, Tani M, Uemoto S. Diverse antitumor effects of ascorbic acid on cancer cells and the tumor microenvironment. *Frontiers in oncology*. 2022 Sep 20;12:981547. [[10.3389/fonc.2022.981547](https://doi.org/10.3389/fonc.2022.981547)][PMID]
10. Kim JE, Kang JS, Lee WJ. Vitamin C induces apoptosis in human colon cancer cell line, HCT-8 via the modulation of calcium influx in endoplasmic reticulum and the dissociation of bad from 14-3-3 β . *Immune network*. 2012 Oct;12(5):189-95. [[10.4110/in.2012.12.5.189](https://doi.org/10.4110/in.2012.12.5.189)][PMID]
11. Wei X, Xu Y, Xu FF, Chaiswing L, Schnell D, Noel T, Wang C, Chen J, St. Clair DK, St. Clair WH. RelB expression determines the differential effects of ascorbic acid in normal and cancer cells. *Cancer research*. 2017 Mar 15;77(6):1345-56. [[10.1158/0008-5472.CAN-16-0785](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0785)][PMID]
12. Samie KA, Dayer D, Eshkiki ZS. Human colon cancer HT29 cell line treatment with high-dose l-ascorbic acid results to reduced angiogenic proteins expression and elevated pro-apoptotic proteins expression. *Current Molecular Medicine*. 2023 Jun 1;23(5):470-8. [[10.2174/1566524022666220616141725](https://doi.org/10.2174/1566524022666220616141725)][PMID]
13. Szarka A, Kapuy O, Lőrincz T, Bánhegyi G. Vitamin C and cell death. *Antioxidants & redox signaling*. 2021 Apr;34(11):831-44. [[10.1089/ars.2019.7897](https://doi.org/10.1089/ars.2019.7897)][PMID]
14. Jang MS, Lee SJ, Kang NS, Kim E. Cooperative phosphorylation of FADD by Aur-A and Plk1 in response to taxol triggers both apoptotic and necrotic cell death. *Cancer research*. 2011 Dec 1;71(23):7207-15. [[10.1158/0008-5472.CAN-11-0760](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0760)][PMID]
15. Diao Y, Ma X, Min W, Lin S, Kang H, Dai Z, Wang X, Zhao Y. Dasatinib promotes paclitaxel-induced necroptosis in lung adenocarcinoma with phosphorylated caspase-8 by c-Src. *Cancer Letters*. 2016 Aug 28;379(1):12-23. [[10.1016/j.canlet.2016.05.003](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.05.003)][PMID]
16. Liao P-C, Lieu C-H. Cell cycle specific induction of apoptosis and necrosis by paclitaxel in the leukemic U937 cells. *Life sciences*. 2005;76(14):16.39-23. [[10.1016/j.lfs.2004.09.021](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.09.021)][PMID]
17. LingHu HR, Luo H, Gang L. Bufalin induces glioma cell death by apoptosis or necroptosis. *OncoTargets and therapy*. 2020 May 27;4767-78. [[10.2147/OTT.S242567](https://doi.org/10.2147/OTT.S242567)][PMID]
18. Baek MW, Cho HS, Kim SH, Kim WJ, Jung JY. Ascorbic acid induces necrosis in human laryngeal squamous cell carcinoma via ROS, PKC, and calcium signaling. *Journal of cellular physiology*. 2017 Feb;232(2):417-25. [[10.1002/jcp.25438](https://doi.org/10.1002/jcp.25438)][PMID]
19. Furqan M, Abu-Hejleh T, Stephens LM, Hartwig SM, Mott SL, Pulliam CF, Petronek M, Henrich JB, Fath MA, Houtman JC, Varga SM. Pharmacological ascorbate improves the response to platinum-based chemotherapy in advanced stage non-small cell lung cancer. *Redox biology*. 2022 Jul 1;53:102318.



Authors retain the copyright and full publishing rights.
Published by [Ahvaz Jundishapur University of Medical Science](https://www.jundishapur.ac.ir).
This article is an open access article licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).